3 月 March
2020, 63(3): 245 – 254
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.03.001

家蚕 miR-2769 靶基因的鉴定及表达分析

孙妍妍[1,2], 王景娅[1,2], 王 露[2], 李晓哲[2], 阚云超[2], 乔惠丽[2,*]

(1. 郑州大学生命科学学院, 郑州 450001; 2. 南阳师范学院, 河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 河南南阳 473061)

摘要:【目的】MiRNAs 在昆虫变态发育过程中发挥非常重要的作用。对家蚕 *Bombyx mori* miRNAs 及靶基因的研究将有助于阐明 miRNAs 参与调控家蚕变态发育的分子机制。【方法】往家蚕 5 龄第 2 天幼虫血淋巴注射蜕皮激素 20E 后, qRT-PCR 检测 miR-2769 在家蚕脂肪体中的表达; 通过生物信息学方法预测家蚕 miR-2769 的靶基因; 利用双荧光酶报告载体系统分析 miR-2769 与预测靶基因 *BmE75B* 的互作; qRT-PCR 检测 miR-2769 及其靶基因 *BmE*75 不同剪接体在家蚕不同发育时期(幼虫、蛹和成虫)和幼虫不同组织(头、表皮、丝腺、脂肪体、精巢、卵巢、马氏管、中肠和血淋巴)中的表达量。【结果】研究结果表明, miR-2769 可通过与家蚕 *BmE75B* 的 3′UTR 区结合位点的互作, 显著抑制荧光素酶报告基因的表达。qRT-PCR 结果表明, miR-2769 和 *BmE75A*/*BmE75B* 在 20E 诱导家蚕脂肪体中表达趋势相反。时空表达分析结果表明, miR-2769 与 *BmE*75 的不同剪接体在家蚕不同发育时期和不同组织中均具有特异性表达特征。在家蚕变态发育的不同阶段, miR-2769 和 *BmE75A* 的表达量均较低, 而 *BmE75B* 在蛹期表达量较高, *BmE75C* 在 5 龄末幼虫和蛹早期有极高表达水平。此外, miR-2769 与 *BmE*75 不同剪接体均存在一定程度的表达负相关。在家蚕 5 龄幼虫血淋巴中 miR-2769 可促进 *BmE75A* 的表达, 在脂肪体中 miR-2769 可促进 *BmE75B* 的表达, 而在其他组织中 miR-2769 抑制 *BmE*75 不同剪接体的表达。【结论】家蚕 miR-2769 可通过与 *BmE75B* 的 3′UTR 区的互作对 *BmE*75 不同剪接体的表达进行负调控。

关键词: 家蚕; 变态发育; 蜕皮激素; miRNAs; 靶基因; qRT-PCR; 表达分析

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)03-0245-10

Identification and expression analysis of miR-2769 target gene in *Bombyx mori*

SUN Yan-Yan[1,2], WANG Jing-Ya[1,2], WANG Lu[2], LI Xiao-Zhe[2], KAN Yun-Chao[2], QIAO Hui-Li[2,*]
(1. School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Henan Provincial Key Laboratory of Insect Biology in Funiu Mountain, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract:【Aim】MiRNAs play very important roles in insect metamorphosis. The study of miRNAs and their target genes in *Bombyx mori* will help to elucidate the molecular mechanism of miRNAs involved in the metamorphosis of this insect.【Methods】The expression of miR-2769 in the fat body of *B. mori* was detected by qRT-PCR after injecting molting hormone, 20-hydroxyecdysone (20E), into the hemolymph of the day-2 5th instar larvae. The target genes of miR-2769 of *B. mori* were predicted by bioinformatics methods. The interaction between miR-2769 and its predicted target gene *BmE75B* was analyzed by dual luciferase reporter assay system. The expression levels of miR-2769 and different splice isoforms of its target gene *BmE*75 at different developmental stages (larva, pupa and adult) and larval tissues (head,

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目(182102110447); 河南省高等学校青年骨干教师项目(2016GGJS-127)
作者简介: 孙妍妍, 女, 1994 年 5 月生, 河南周口人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: 565340120@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: qiaohuili@nynu.edu.cn
收稿日期 Received: 2019-05-31; 接受日期 Accepted: 2019-12-18

epidermis, silk gland, fat body, testis, ovary, Malpighian tubules, midgut and hemolymph) of *B. mori* were detected by qRT-PCR. 【Results】The results showed that miR-2769 could significantly inhibit the expression of luciferase reporter gene by interacting with the 3′UTR binding site of *BmE75B* of *B. mori*. The qRT-PCR results showed that miR-2769 and *BmE75A*/*BmE75B* presented the opposite expression trends in the fat body of *B. mori* post induction by 20E. The spatio-temporal expression analysis showed that miR-2769 and different splice isoforms of the target gene *BmE75* had specific expression characteristics in different developmental stages and larval tissues of *B. mori*. The expression levels of miR-2769 and *BmE75A* were low in *B. mori* at different developmental stages; however, the expression level of *BmE75B* was relatively high in the pupal stage and that of *BmE75C* was extremely high in the late 5th instar larvae and early pupae. Furthermore, the expression of miR-2769 was negatively correlated with that of different splice isoforms of *BmE75*. miR-2769 promoted the expression of *BmE75A* in the hemolymph and *BmE75B* in the fat body of the 5th instar larvae of *B. mori*, while it inhibited the expression of different splice isoforms of *BmE75* in other tissues. 【Conclusion】MiR-2769 can negatively regulate the expression of different splice isoforms of *BmE75* by interacting with the 3′UTR region of *E75B* in *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; metamorphosis; molting hormone; miRNAs; target gene; qRT-PCR; expression analysis

MicroRNAs(miRNAs)是一种内源性小分子非编码 RNA,长度约 22 nt,广泛存在于原生动物、病毒、植物和动物中,且物种间具有高度保守性(Ambros, 2004; Bartel, 2004)。miRNAs 通过与靶基因的非翻译区或编码区结合,在转录后或翻译水平上调节靶基因 mRNA 的降解或蛋白的表达,参与调控细胞增殖分化(Li *et al*., 2013)、凋亡(He *et al*., 2013; Li *et al*., 2018)、自噬(Nelson *et al*., 2014; Texada *et al*., 2019; Zhao *et al*., 2019)、免疫(Silwal *et al*., 2019; Xu *et al*., 2019)、发育和代谢(He and Hannon, 2004; Ameres and Zamore, 2013)等几乎所有的生命活动过程。lin-4 和 lin-7 是最早在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中发现的 miRNAs(Lee *et al*., 1993);在哺乳动物中,约 50% 的编码蛋白基因表达受 miRNAs 的调控(Krol *et al*., 2010);miRNAs 同样在昆虫中广泛存在,并在昆虫变态发育和生殖过程中发挥重要作用(Behura, 2007; Lucas and Raikhel, 2013; Liu *et al*., 2018, 2019)。

昆虫的变态发育由蜕皮激素 20E 和保幼激素(juvenile hormone, JH)协同调控,研究发现,20E 不仅可抑制 PI3K-Akt 信号通路而促进自噬的起始,同时可与 20E 受体 EcR-USP 的异源二聚体结合,启动 20E 初级应答基因 *Br-C*, *E74*, *E75* 和 *E93* 的表达,进而通过与特异 DNA 序列结合启动晚期应答基因的表达(Riddiford *et al*., 2000; Yin and Thummel, 2005)。作为 20E 信号通路中的一个初级应答基因,细胞核激素受体 E75(nuclear hormone receptor E75)基因最早在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被鉴定,该基因在果蝇中通过 5′端外显子的可变剪接编码 DmE75A, DmE75B, DmE75C 和 DmE75D 4 个异构体,其中 DmE75A 和 DmE75C 的 DNA 结合结构域含有 2 个锌指结构,DmE75B 含有 1 个锌指结构,DmE75D 没有 DNA 结合结构域(Feigl *et al*., 1989; Segraves and Hogness, 1990; Bernardo *et al*., 2009)。在家蚕中,*E75* 基因具有 *BmE75A*, *BmE75B* 和 *BmE75C* 3 个可变剪接体,且其编码蛋白同样具有相同的 C 末端和不同的 N 末端(Segraves and Hogness, 1990)。对 *BmE75A*, *BmE75B* 和 *BmE75C* 在家蚕 BmN 细胞、前胸腺和脂肪体中的表达研究结果也表明,*BmE75A*, *BmE75B* 和 *BmE75C* 具有不同的组织和时期特异性,而且三者的表达与 20E 的滴度密切相关(Li *et al*., 2015)。近年研究表明,E75 基因可参与不同昆虫幼虫到蛹的变态发育过程(Guo *et al*., 2016; Liu *et al*., 2018; Peng *et al*., 2019)。

家蚕 *Bombyx mori* 作为重要的经济昆虫,是研究昆虫变态发育分子机制的重要模式生物。家蚕的变态发育过程由 20E 和 JH 协同调控。在昆虫变态发育过程中需经历复杂的器官重建过程,脂肪体的自噬和凋亡对家蚕变态发育过程十分重要(Ihry and Bashirullah, 2014; Hu *et al*., 2016)。本研究通过生物信息学方法分析预测家蚕 miR-2769 在 20E 处理后家蚕脂肪体中差异表达基因中的关联靶基因,利

用双荧光素酶报告基因检测系统对 miR-2769 与其靶基因 *BmE75B* 的互作进行鉴定，进一步通过 qRT-PCR 检测 miR-2769、靶基因 *BmE75B* 及其不同剪接体 *BmE75A* 和 *BmE75C* 在 20E 处理后家蚕脂肪体及不同发育时期和不同组织的表达特征，从而阐明 miR-2769 及其靶基因 *BmE75B* 在家蚕变态发育过程中的作用。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

供试家蚕为二化性的大造 p50 品系，常规条件下对蚕卵进行催青，幼虫用新鲜桑叶饲养。收集 5 龄第 2 天家蚕幼虫进行血淋巴注射蜕皮激素 20E (2 μg/μL)，每头家蚕注射 5 μg，对照注射等体积无菌水稀释 10 倍的无水乙醇溶剂。注射后 2，6，12 和 24 h 后分别取处理和对照的家蚕幼虫脂肪体。家蚕头、表皮、丝腺、脂肪体、精巢、卵巢、马氏管、中肠和血淋巴的组织取自正常家蚕 5 龄第 3 天幼虫；在 4 龄幼虫、5 龄幼虫、蛹期至羽化后 3 d 成虫期间，每天分别随机取整虫，幼虫去中肠。每个样品 3 组，每组来自 5 头个体。所有样品液氮速冻后 −80℃ 冰箱保存备用。

大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 细胞，人胚胎肾细胞 HEK293T 细胞，psiCheck2 载体为实验室保存，用于基因克隆的载体和试剂有 pMD-19T 载体 (TaKaRa，大连)，Trizol Reagent (Invitrogen，美国)，RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermofisher，美国)，限制性内切酶 (Fermentas，美国)，质粒 DNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒 (Axygen，美国)，*Taq* 酶 (Vazyme，南京)，T4 DNA 连接酶 (Thermofisher，美国)；用于细胞培养的试剂有 DMEM 高糖培养基 (Hyclone，美国)，胎牛血清 (BI，以色列)，细胞转染试剂为 X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche，瑞士)，双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega，美国)，qRT-PCR 试剂为 FastStart 通用型 SYBR® Green 预混液 (Roche，瑞士) 和 All-in-one™ miRNA qRT-PCR 检测试剂盒 (Genecopia，美国)。

1.2　家蚕总 RNA 的提取

将 1.1 节不同家蚕样品分别用液氮研磨，取约 100 mg 粉末加入 1 mL Trizol 试剂，按照 RNA 提取说明书进行抽提，RNA 沉淀充分溶解后用超微量核酸蛋白测定仪 (NanoDrop ND-2000) 对总 RNA 的浓度和纯度进行测定。

1.3　家蚕 miR-2769 的序列和表达分析

根据前期测序获得的成熟 miR-2769 的序列 (AUAUAUUAUCAGAUUUUCGGUC) 设计上游引物 (5′-ATATATTATCAGATTTTCGGTC-3′)，以 All-in-one™ miRNA qRT-PCR 检测试剂盒中的通用的接头引物 (Genecopia，美国) 为下游引物，对 1.2 节家蚕脂肪体 RNA 进行反转录，以反转录合成的 cDNA 为模板，利用 All-in-one™ miRNA qRT-PCR 检测试剂盒进行 PCR 扩增，扩增条件：预变性 95℃ 5 min；95℃ 15 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，共 30 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物纯化后连接 pMD-19T 载体，连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞，挑取鉴定后的阳性克隆送深圳华大基因科技有限公司进行测序。

利用 All-in-one™ miRNA qRT-PCR 检测试剂盒对 miR-2769 在 1.1 节中 20E 处理组与对照组的 2，6，12 和 24 h 的脂肪体组织中的表达进行 qRT-PCR 检测。内参基因为家蚕 5S rRNA (GenBank 登录号：M35394.1)，引物序列为 5S-F：5′-CGTCCGATCACCGAAGTCAAG-3′；5S-R：5′-AGGCGGTCACCCATCCAAGTA-3′。扩增条件：95℃ 5 min；95℃ 15 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，共 40 次循环；最后 72℃ 延伸 10 min，溶解曲线范围为 65℃ ~95℃。

1.4　家蚕 miR-2769 靶基因的预测及表达分析

课题组前期对 20E 处理前后的家蚕脂肪体进行了转录组测序，据此利用软件 miRanda 和生物信息学方法对 20E 处理前后家蚕脂肪体转录组数据中差异表达基因中的 miR-2769 靶基因进行预测。利用 ClustalW2 在线分析软件 (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) 对 miR-2769 靶基因 *BmE75B* (GenBank 登录号：NM_001112610.1) 及其不同剪接体 *BmE75A* (GenBank 登录号：NM_001112609.1) 和 *BmE75C* (GenBank 登录号：NM_001043577.1) 的序列进行比对分析。

以 1.2 节提取的家蚕幼虫脂肪体 RNA 为模板，利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成 cDNA，利用 FastStart 通用型 SYBR® Green 预混液对 miR-2769 靶基因 *BmE75B* 及其不同剪接体 *BmE75A* 和 *BmE75C* 进行 qRT-PCR 检测。扩增条件：95℃ 5 min；95℃ 15 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，共 40 次循环；最后 72℃ 延伸 10 min，溶解曲线范围为 65℃ ~95℃。*BmE75B* 的引物序列为 BmE75B-F：5′-CACTCGGTGCTAGTGAGCAT-3′；BmE75B-R：

5′-TGCAGGGCCGGTATTGTATC-3′。*BmE75A* 的引物序列为 BmE75A-F：5′-GGAACGTGAACCTGAATTGC-3′；BmE75A-R：5′-TGCAGGGCCGGTATTGTATC-3′。*BmE75C* 的引物序列为 BmE75C-F：5′-AGTGTTATCCGAAGTTGTCAC-3′；BmE75C-R：5′-GAATGATGGAGGCTTGAGGA-3′。上述引物序列分别对应于 *BmE75B*，*BmE75A* 和 *BmE75C* 的 N 端特异序列。内参基因为家蚕 *BmactinA*3（GenBank 登录号：U49854），引物序列 BmA3-F：5′-ATGTGCGACGAAGAAGTTGC-3′；BmA3-R：5′-GTCTCCTACGTACGAGTCCT-3′。

1.5　家蚕 miR-2769 的合成和 *BmE75B* 3′UTR 双荧光素酶报告载体构建

根据成熟 miR-2769 的序列及其与预测靶基因 *BmE75B* 的互作结合位点序列，由上海吉玛生物技术有限公司设计并合成 miR-2769 的野生型模拟物 miR-2769 mimics（5′-AUAUAUUAUCAGAUUUCGGUC-3′）、互作位点突变后的 miR-2769 mutant（5′-AAUAUAAUUCAGAUUUUCGGUC-3′）及阴性对照 miR-2769 NC（5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′）。

以 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成的家蚕脂肪体 cDNA 为模板，利用 *BmE75B* 3′UTR 序列的特异引物，PCR 扩增 277 bp 目的片段，纯化后扩增产物和 psiCheck2 载体分别用限制性内切酶 *Xho* Ⅰ和 *Not* Ⅰ进行双酶切，酶切产物切胶纯化后用 T4 DNA 连接酶连接，连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞，经菌液 PCR 和双酶切鉴定后的 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 阳性克隆送深圳华大基因科技有限公司进行测序验证。引物序列为 *BmE75B* 3′UTR-*Xho* Ⅰ-F：5′-AGCTCGAGGCCCCGACCTACTTTAAA-3′；*BmE75B* 3′-UTR-*Not* Ⅰ-R：5′-ATGCGGCCGCAATTCGACAACCTGTC-3′（下划线为酶切位点）。

1.6　家蚕 miR-2769 与靶基因 *BmE75B* 的互作分析

HEK293T 细胞于 37℃，5% CO_2 的条件下，用 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。将生长状态良好的细胞提前 1 d 铺于 24 孔板中用于转染实验。将合成的 miR-2769 mimics，miR-2769 mutant 和 miR-2769 NC 分别与 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 共转染 HEK293T 细胞，psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 质粒单转为对照，根据 X-tremeGENE siRNA 转染试剂的说明书，优化后每个孔中质粒 DNA 的量为 100 ng，miRNA 的终浓度为 0.1 μmol/L，每组转染 3 个重复，实验重复 3 次。转染后 48 h 收集细胞，根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书，对细胞进行裂解，利用化学发光仪依次检测海肾荧光素酶活性与萤火虫荧光素酶活性，二者的比值为萤火虫荧光素酶的相对活性（杨娟娟等，2018）。

1.7　家蚕 miR-2769 与靶基因 *BmE75* 不同剪接体的表达分析

以 1.2 节提取的家蚕 5 龄幼虫不同组织、4 龄幼虫到 3 日龄成虫整虫的 RNA 为模板，利用 All-in-one™ miRNA qRT-PCR 检测试剂盒进行反转录后对 miR-2769 进行 qRT-PCR 检测，内参基因为家蚕 5S rRNA（方法同 1.3 节）。同时，利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成上述 RNA 的 cDNA，利用 FastStart 通用型SYBR® Green 预混液对 *BmE75B* 及其不同剪接体 *BmE75A* 和 *BmE75C* 进行 qRT-PCR 检测，内参基因为家蚕 *BmactinA*3（方法同 1.4 节）。

1.8　数据分析

双荧光素酶活性检测结果，根据萤火虫荧光素酶活性进行校正，以海肾荧光素酶活性与萤火虫荧光素酶活性的比值为萤火虫荧光素酶的相对活性，利用 Prism 5.0 作图软件进行作图和统计分析。qRT-PCR 扩增结果用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行数据分析，针对不同内参基因的 qRT-PCR 扩增结果，先通过计算两个内参基因 Ct 值的几何平均数对不同内参基因的扩增进行校正，再用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行数据分析，最后用 Prism 5.0 软件进行作图和统计分析。

2　结果

2.1　家蚕 miR-2769 的序列和表达分析

以家蚕脂肪体组织 RNA 反转录后的 cDNA 为模板，PCR 扩增 miR-2769，扩增产物连接 pMD-19T 克隆载体，连接产物经初步鉴定后进行测序，测序结果表明扩增后 miRNA 序列与成熟 miR-2769 序列完全一致。利用 qRT-PCR 检测 miR-2769 在 20E 处理后 2，6，12 和 24 h 的家蚕 5 龄第 2 天幼虫脂肪体组织中的表达情况。结果如图 1 所示，与对照相比，miR-2769 在 20E 处理后 2，6 和 12 h 表达显著下调（$P<0.05$），24 h 时差异不显著（$P>0.05$）。

2.2　家蚕 miR-2769 靶基因的预测及表达分析

通过生物信息学预测，发现 miR-2769 的一个靶基因是家蚕的核激素受体基因 *BmE75* 的一个可变剪接体 *BmE75B*。miR-2769 第 2－8 位种子序列与预测靶基因 *BmE75B* 3′UTR 存在互补配对（图 2：A）。利用 ClustalW2 在线分析软件对 *BmE75B* 不同

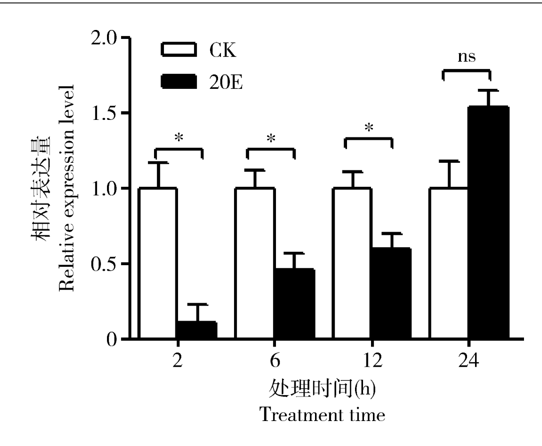


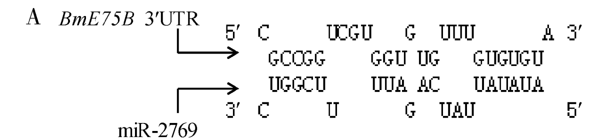
图 1　qRT-PCR 检测 miR-2769 在 20E 处理后不同时间家蚕幼虫脂肪体中的表达模式

Fig. 1　Expression profiles of miR-2769 in larval fat body of *Bombyx mori* at different time after treatment with 20E by qRT-PCR

处理组中往 5 龄第 2 天家蚕幼虫血淋巴中注射蜕皮激素 20E（2 μg/μL），每头注射 5 μg，对照组注射等体积无菌水稀释 10 倍的无水乙醇溶剂。图 3 同。In the treatment group, 2 μg/μL of molting hormone 20E (5 μg per individual) was injected into the hemolymph of the day-2 5th instar larvae, while in the control group (CK), an equal volume of ethanol in 10-fold dilution with distilled water was injected. The same for Fig. 3. CK：无水乙醇 Ethanol. 图中数据为平均值 ± 标准误，用双尾配对 *t* 检验进行统计分析。Data in the figure are mean ± *SE*, and statistics analysis was performed by two tailed, paired *t*-test. $^*P<0.05$；^{ns}无显著差异 No significant difference ($P>0.05$).

剪接体的氨基酸序列比对，分析结果表明，BmE75A，BmE75B 和 BmE75C 的氨基酸序列具有不同的 N 端序列和完全相同的 C 末端（图 2：B）。同时 *BmE75A*，*BmE75B* 和 *BmE75C* 的 3′UTR 区 DNA 序列也完全一致，因此 *BmE75A* 和 *BmE75C* 的 3′UTR 区也存在 miR-2769 的结合位点。

为了比较预测靶基因 *BmE75B* 及其剪接体与 miR-2769 在 20E 处理后家蚕幼虫脂肪体组织中的表达，利用 qRT-PCR 检测 *BmE75B* 在 20E 处理组与对照组在 2，6，12 和 24 h 脂肪体组织中的表达。结果如图 3（A）所示，与 miR-2769 的表达（图 1）相反，*BmE75B* 在 20E 处理后 2，6 和 12 h 表达显著上调（$P<0.001$），24 h 时表达差异不显著（$P>0.05$）。同时也检测了 *BmE75A* 和 *BmE75C* 在相同样品中的表达情况，结果如图 3（B）和 3（C）所示，与 *BmE75B* 类似，*BmE75A* 在 20E 处理后 2，6 和 12 h 家蚕幼虫脂肪体中表达也显著升高（$P<0.001$），24 h 时表达差异不明显（$P>0.05$）；*BmE75C* 仅在 20E 处理后 6 h 时显著上调（$P<0.01$），2，12 和 24 h 时与对照相比无显著差异（$P>0.05$）。由此可见，在脂肪体中 miR-2769 与 *BmE75A* 和 *BmE75B* 的表达存在负相关，推测在家蚕脂肪体中 miR-2769 可通过与靶基因 *BmE75* 3′UTR 的互作调控 *BmE75A* 和 *BmE75B* 的表达。



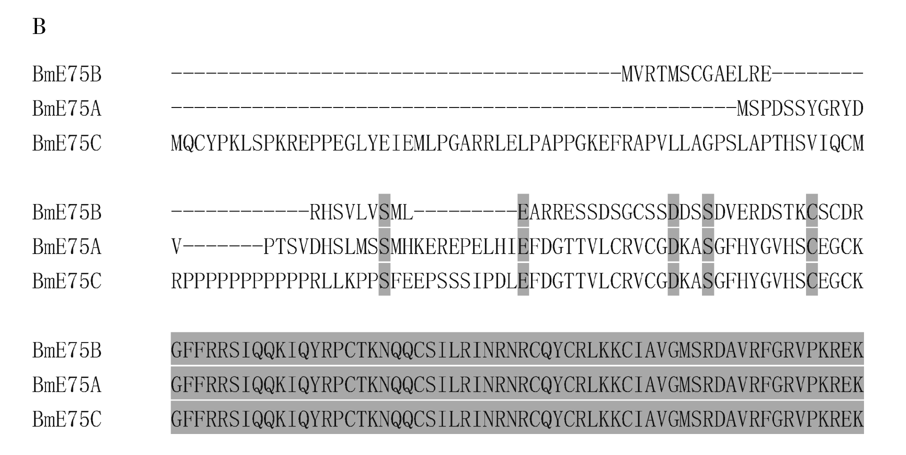


图 2　miR-2769 靶基因预测（A）和靶基因及其不同剪接体的序列比对分析（B）

Fig. 2　Prediction of miR-2769 target gene (A) and multiple sequence alignment of the target gene and its different splice isoforms (B)

A：miR-2769 在靶基因 *BmE75B* 3′UTR 上的结合位点预测 Predicted binding site of miR-2769 in 3′UTR of the target gene *BmE75B*；B：靶基因不同剪接体的 N 端氨基酸序列分析 N-terminal amino acid sequence analysis of different splice isoforms of the target gene.

图 3　qRT-PCR 检测 miR-2769 靶基因 *BmE*75 不同剪接体在 20E 处理后不同时间家蚕幼虫脂肪体中的表达模式

Fig. 3　Expression profiles of different splice isoforms of the target gene *BmE*75 of miR-2769 in larval fat body of *Bombyx mori* at different time after treatment with 20E by qRT-PCR

A: *BmE75B*; B: *BmE75A*; C: *BmE75C*. 图中数据为平均值 ± 标准误,用双尾配对 *t* 检验进行统计分析. Data in the figure are mean ± *SE*, and statistics analysis was performed by two tailed, paired *t*-test. *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; ns 无显著差异 No significant difference ($P>0.05$).

2.3　双荧光素酶报告载体系统分析 miR-2769 与 *BmE75B* 的互作

BmE75B 3′UTR 序列的 PCR 扩增结果如图 4(A)所示,扩增产物的分子量大小与理论一致。扩增产物连接 psiCheck2 双荧光素酶报告基因载体后的双酶切鉴定结果如图 4(B)所示,酶切产物大小与理论分子量相符。构建好的 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 双荧光素酶报告载体经测序验证正确。

将 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 双荧光素酶报告载体分别与合成的 miR-2769 mimics, miR-2769 mutant 和 miR-2769 NC 共转染 HEK293T 细胞,以 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 质粒单转为对照,利用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测转染后各组的海肾荧光素酶活性与萤火虫荧光素酶活性,二者的比值为萤火虫荧光素酶的相对活性。结果如图 5 所示,与 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 质粒单转染对照相比,只有 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 与 miR-2769 mimics 共转染时,报告基因的荧光素酶相对活性显

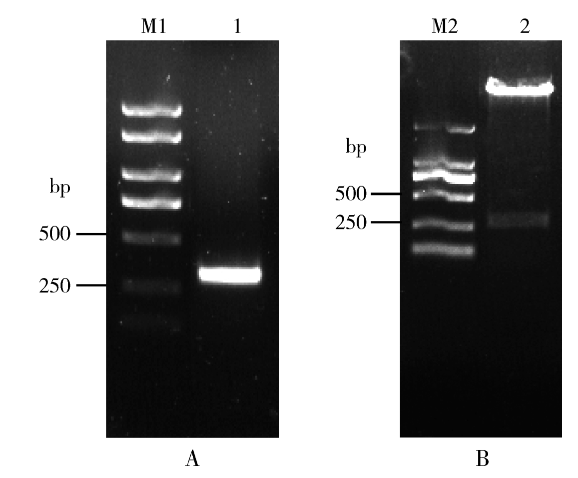


图 4　*BmE75B* 3′UTR 序列的 PCR 扩增(A)和双荧光素酶报告载体 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 的酶切鉴定(B)

Fig. 4　PCR amplification of *BmE75B* 3′UTR (A) and identification (B) of dual luciferase report vector of psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR by restriction digestion

M1: DL2000 Plus DNA Ladder; 1: *BmE75B* 3′UTR PCR 扩增结果 PCR product of *BmE75B* 3′UTR; M2: DL2000 DNA Ladder; 2: psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 双酶切鉴定 Identification of psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR with double enzyme digestion.

著降低($P<0.05$)，而 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 与 miR-2769 mutant 或 miR-2769 NC 共转染后的酶活性与对照质粒无显著差异($P>0.05$)。由此表明，miR-2769 能够通过与靶基因 *BmE75B* 3′UTR 区的互作负调控 *BmE75B* 在翻译水平的表达。由于 *BmE75A* 和 *BmE75C* 的 3′UTR 也具有 miR-2769 的作用位点，因此，推测 miR-2769 也可调控 *BmE75A* 和 *BmE75C* 的表达。

2.4　家蚕 miR-2769 与靶基因 *BmE75* 不同剪接体的表达分析

利用 qRT-PCR 进一步明确 miR-2769 及其靶基因 *BmE75* 不同剪接体在家蚕变态发育不同阶段的表达是否存在负相关，结果如图 6 所示，*BmE75B* 在家蚕整个蛹期不同阶段的表达量相对较高，而 miR-2769 在所有的发育阶段的表达量都较低；*BmE75A* 和 *BmE75C* 的表达特征也不同于 *BmE75B*，*BmE75A* 与 miR-2769 相似，在所有发育时期的表达量都较低，*BmE75C* 则在 5 龄末和蛹早期具有极高的表达量；另由图中小图可见，虽然 miR-2769 与 *BmE75A* 的表达量较低，但二者的表达仍存在负相关。由此表明，miR-2769 与 *BmE75A*，*BmE75B* 和 *BmE75C* 在家蚕变态发育的不同阶段均存在一定程度的表达负相关。

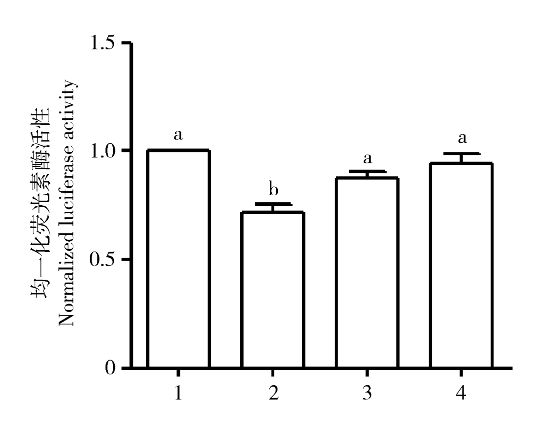


图 5　psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 质粒与 miR-2769 转染 HEK293T 细胞后荧光素酶活性分析

Fig. 5　Analysis of luciferase activity in HEK293T cells after transfected with psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR and miR-2769

1：psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR 单转对照 psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR vector control；2：psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR + miR-2769 mimics；3：psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR + miR-2769 mutant；4：psiCheck2/*BmE75B* 3′UTR + miR-2769 NC. 图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同字母表示差异显著($P<0.05$，单因素方差分析，Tukey 氏检验)。Data in the figure are mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference ($P<0.05$, one-way ANOVA, Tukey's test).

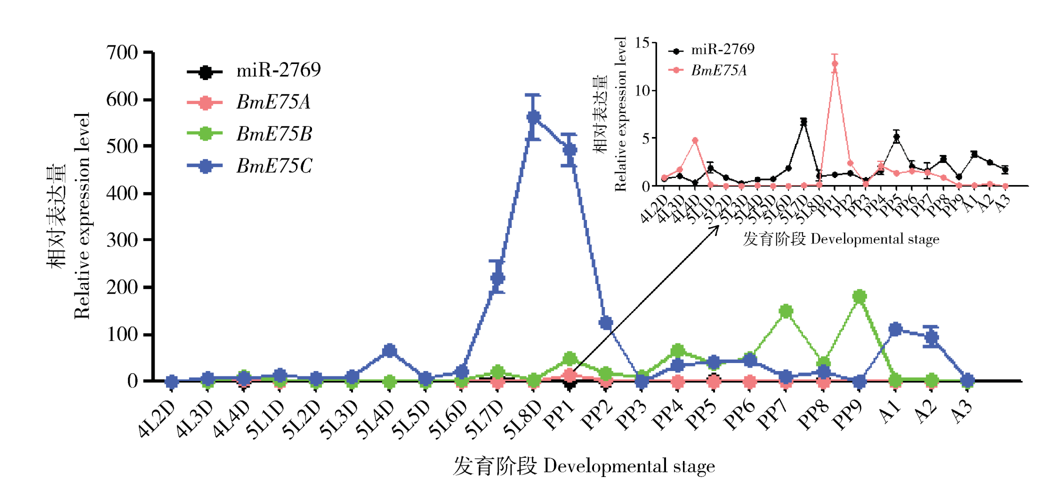


图 6　qRT-PCR 检测 miR-2769 及其靶基因 *BmE75* 不同剪接体在家蚕不同发育阶段的表达模式

Fig. 6　Expression profiles of miR-2769 and different splice isoforms of its target gene *BmE75* in different developmental stages of *Bombyx mori* by qRT-PCR

4L2D－5L8D：分别为 4 龄第 2 天至 5 龄第 8 天 2nd day of the 4th instar to the 8th day of the 5th instar, respectively；PP1－PP9：分别为蛹期第 1－9 天 1st－9th day of the pupal stage, respectively；A1－A3：分别为成虫第 1－3 天 1st－3rd day of the adult stage, respectively. 幼虫去中肠。图中数据为平均值 ± 标准误；小图为 miR-2769 和 *BmE75A* 调整坐标轴刻度后的表达量。The midgut of larvae was removed. Data in the figure are mean ± *SE*. Inset shows the expression of miR-2769 and *E75A* in adjusted *Y* axis scale.

为了进一步分析 miR-2769 与其靶基因 *BmE75* 不同剪接体在家蚕个体中的表达情况，首先以家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织的 cDNA 为模板，利用 qRT-PCR 分别对 miR-2769 和 *BmE75* 不同剪接体进行检测。结果表明，miR-2769 在 5 龄幼虫的精巢和卵巢中的相对表达量较高，其他组织的表达量相对

较少；靶基因 *BmE75B* 在精巢、卵巢和脂肪体中的表达量相对较高，除头部、表皮、血淋巴和马氏管中表达量无显著性差异($P>0.05$)外，其他组织中 miR-2769 与 *BmE75B* 的表达差异均为显著($P<0.05$)。而 *BmE75A* 和 *BmE75C* 具有不同于 *BmE75B* 的表达特征，*BmE75A* 在血淋巴和卵巢中表达量较高，而 *BmE75C* 的整体表达量都不高，但 miR-2769 与 *BmE75A* 和 *BmE75C* 在多个不同组织中的表达也存在显著差异($P<0.05$)(图 7)。

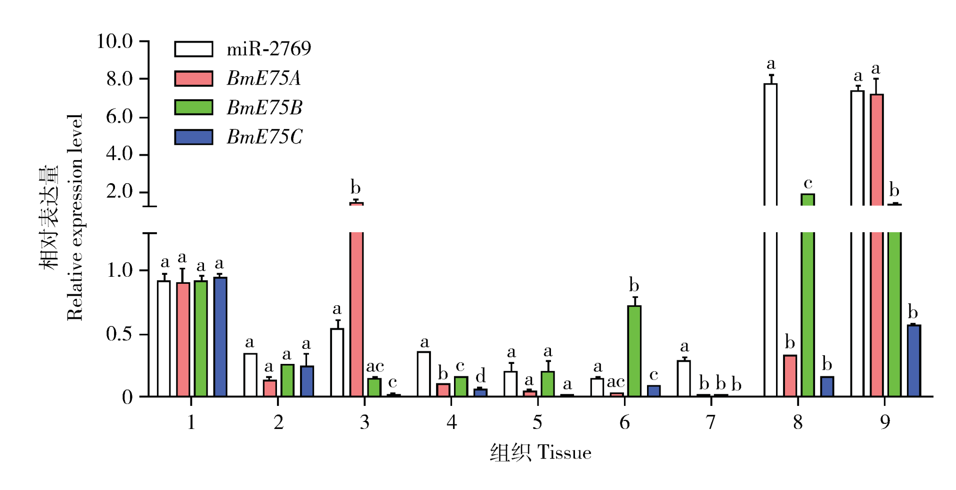


图 7 qRT-PCR 检测 miR-2769 及其靶基因 *BmE75* 不同剪接体在家蚕 5 龄幼虫不同组织中的表达模式

Fig. 7 Expression profiles of miR-2769 and different splice isoforms of its target gene *BmE75* in different tissues of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* by qRT-PCR

1：头部 Head；2：表皮 Epidermis；3：血淋巴 Hemolymph；4：中肠 Midgut；5：马氏管 Malpighian tubules；6：脂肪体 Fat body；7：丝腺 Silk gland；8：精巢 Testis；9：卵巢 Ovary. 图中数据为平均值±标准误；柱上不同字母表示差异显著($P<0.05$，单因素方差分析)。Data in the figure are mean ± *SE*, and different letters above bars indicate significant difference ($P<0.05$, one-way ANOVA).

3 讨论

miRNAs 是一类小分子量的非编码 RNA，主要通过与靶基因的互作调控 mRNA 的降解和翻译抑制。本研究发现家蚕 miR-2769 在 20E 诱导早期的脂肪体中表达下调(图 1)，*BmE75B* 作为 miR-2769 的预测靶基因，在 20E 诱导后家蚕脂肪体中的表达与 miR-2769 的表达相反。同时 20E 在家蚕脂肪体中可快速诱导 *BmE75A* 的高表达，而 *BmE75C* 在 20E 诱导后表达升高较慢，且表达水平相对较低(图 3)。利用 NCBI 数据中的 Blast 比对分析表明，家蚕的 *BmE75A*，*BmE75B* 和 *BmE75C* 与黑腹果蝇 *DmE75A*，*DmE75B* 和 *DmE75C* 编码的氨基酸序列一致性约为 50%。研究表明，黑腹果蝇 *DmE75A* 和 *DmE75B* 被 20E 诱导后快速高表达，*DmE75C* 诱导后表达则较慢且表达量弱的结果一致(Bialecki *et al*., 2002；Bernardo *et al*., 2009)，由此可见，E75 不同剪接体在 20E 诱导后家蚕和果蝇中具有相似的表达特征。同时，前人也研究表明，20E 也可诱导家蚕 *BmE75* 基因的高表达(Matsuoka and Fujiwara, 2000；Swevers *et al*., 2002；Shirai *et al*., 2012)，且 *BmE75A*，*BmE75B* 和 *BmE75C* 对 20E 具有发育阶段和组织的特异表达特征(Li *et al*., 2015)。

利用双荧光素酶报告系统研究 miR-2769 与靶基因的互作，与家蚕中很多 miRNAs 调控靶基因的方式类似(Huang *et al*., 2012；Jiang *et al*., 2013；Ling *et al*., 2015；Liu *et al*., 2018, 2019)，miR-2769 能够通过与靶基因 *BmE75B* 3′UTR 区的序列互作调控靶基因在翻译水平的表达，由于 *BmE75A*，*BmE75B* 和 *BmE75C* 的 3′UTR 具有相同的 miR-2769 互作位点，推测 miR-2769 也可调控 *BmE75A* 和 *BmE75C* 的表达。结果表明在家蚕幼虫脂肪体中，*BmE75A* 和 *BmE75B* 在 20E 诱导家蚕脂肪体后不同时间的表达量均与 miR-2769 的表达具有负相关；在正常家蚕 5 龄幼虫的大部分组织中，miR-2769 与 *BmE75B* 不同剪接体的表达也都存在负相关，由此表明，miR-2769 可能通过与 *BmE75* 3′UTR 的互作调控其不同剪接体在不同组织中的表达。

不同发育阶段和组织中的表达特征表明，miR-2769 与 *BmE75* 的不同剪接体在 4 龄第 2 天到成虫不同发育阶段和 5 龄幼虫不同组织中的表达均具有特异性表达特征。在血淋巴中 miR-2769 可促进 *BmE75A* 的表达，在脂肪体中 miR-2769 可促进

BmE75B 的表达，而在其他大部分组织中 miR-2769 抑制 *BmE*75 不同剪接体的表达（图 7），推测可能与家蚕不同组织中 20E 的滴度变化有关。由于家蚕 4 龄幼虫到成虫为整虫取样，整虫样品中 miR-2769 的模板量可能被稀释，使 miR-2769 在家蚕不同发育时期的表达量整体较低，而 *BmE75A*，*BmE75B* 和 *BmE75C* 在不同阶段的表达量则各不相同，尤其 *BmE75C* 在 5 龄末和蛹初期表达量极高；*BmE75B* 在 5 龄末、蛹期第 1 天、蛹期第 4 天，蛹期第 7 天和羽化前的变态发育时期表达量较高（图 6），该结果与家蚕变态发育过程中 20E 的滴度变化（Burdette，1962）基本一致；*BmE75A* 的表达量则整体较低，但大部分时间点 miR-2769 与 *BmE*75 不同剪接体的表达均为负相关。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫蜕皮和化蛹过程中，检测到 *E75A* 和 *E75B* 的表达与 20E 水平的升高一致，但 *E75A* 的表达稍早于 *E75B*（Zhou *et al*.，1998）。由于 20E 在家蚕不同发育阶段及不同组织的滴度不同，可能使 miR-2769 与 *BmE*75 的不同剪接体在不同组织和不同发育时期表现出不同的调控模式。另外，miR-2769 和 *BmE75B* 在精巢和卵巢中的表达量非常高，而 *BmE75A* 在卵巢中的表达量与 miR-2769 相当（图 7），而非负相关。在家蚕、烟草天蛾 *M. sexta* 和帕眼蝶 *Pararge aegeria* 中卵巢中特异表达的 miR-2763 和 miR-989，在卵巢的发育中发挥作用（Jagadeeswaran *et al*.，2010；Zhang *et al*.，2012；Quah *et al*.，2015），家蚕 miR-2769 是否参与卵巢的发育还有待进一步证实。此外，在雌性果蝇中，*DmE75A* 和 *DmE75B* 在卵室发育和凋亡过程中发挥相反的作用，*DmE75A* 可诱导哺育细胞的凋亡，*DmE75B* 可促进卵的发育（Terashima and Bownes，2006），二者在家蚕卵发育中是否具有相似的功能还未见报道。最近，Liu 等（2018）发现 miR-14 也可通过与靶基因 *E*75 和 *ECR-B* 3′UTR 的互作参与家蚕幼虫的发育过程，由此推测家蚕 *BmE*75 基因可能还存在除 miR-2769 外的其他调控因子，参与其可变剪接和功能调控。

综上所述，miR-2769 作为家蚕 20E 信号通路中关键基因 *BmE*75 新的调控因子，可通过与靶基因 *BmE*75 3′UTR 区的互作对 *BmE*75 不同剪接体进行负调控，同时 miR-2769 与靶基因 *BmE*75 不同剪接体在不同发育时期和不同组织中具有不同的表达特征。该研究不仅丰富了 miRNAs 参与家蚕变态发育调控的功能研究，同时也为家蚕 *BmE*75 不同剪接体的调控机制及其在昆虫变态发育过程中的功能研究提供了新的依据。

参考文献（References）

Ambros V, 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006): 350－355.

Ameres SL, Zamore PD, 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., 14(8): 475－488.

Bartel DP, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281－297.

Behura SK, 2007. Insect microRNAs: structure, function and evolution. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 37(1): 3－9.

Bernardo TJ, Dubrovskaya VA, Jannat H, Maughan B, Dubrovsky EB, 2009. Hormonal regulation of the E75 gene in *Drosophila*: identifying functional regulatory elements through computational and biological analysis. *J. Mol. Biol*., 387(4): 794－808.

Bialecki M, Shilton A, Fichtenberg C, Segraves WA, Thummel CS, 2002. Loss of the ecdysteroid-inducible e75a orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Dev. Cell*, 3(2): 209－220.

Burdette WJ, 1962. Changes in titer of ecdysone in *Bombyx mori* during metamorphosis. *Science*, 135(3502): 432.

Feigl G, Gram M, Pongs OA, 1989. Member of the steroid hormone receptor gene family is expressed in the 20-OH-ecdysone inducible puff 75B in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res*., 17(18): 7167－7178.

Guo WC, Liu XP, Fu KY, Shi JF, Lü FG, Li GQ, 2016. Nuclear receptor ecdysone-induced protein 75 is required for larval-pupal metamorphosis in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Mol. Biol*., 25(1): 44－57.

He L, Hannon GJ, 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet*., 5(7): 522－531.

He X, Dong Y, Wu CW, Zhao Z, Ng SS, Chan FK, Sung JJ, Yu J, 2013. MicroRNA-218 inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis in colon cancer by downregulating BMI1 polycomb ring finger oncogene. *Mol. Med*., 18(12): 1491－1498.

Hu W, Liu C, Cheng T, Li W, Wang N, Xia Q, 2016. Histomorphometric and transcriptomic features characterize silk glands′ development during the molt to intermolt transition process in silkworm. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 76: 95－108.

Huang Y, Zou Q, Song F, Wang X, Shen XJ, 2012. The regulation of silkworm fibroin L chain production by miRNA-965 and miRNA-1926 in insect cells. *Russian J. Bioorg. Chem*., 38(4): 417－421.

Ihry RJ, Bashirullah A, 2014. Genetic control of specificity to steroid-triggered responses in *Drosophila*. *Genetics*, 196(3): 767－780.

Jagadeeswaran G, Zheng Y, Sumathipala N, Jiang H, Arrese EL, Soulages JL, Zhang W, Sunkar R, 2010. Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. *BMC Genomics*, 11: 52.

Jiang J, Ge X, Li Z, Wang Y, Song Q, Stanley DW, Tan A, Huang Y,

2013. MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(8): 692–700.

Krol J, Loedige I, Filipowicz W, 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.*, 11(9): 597–610.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5): 843–854.

Li K, Guo E, Hossain MS, Li Q, Cao Y, Tian L, Deng X, Li S, 2015. *Bombyx* E75 isoforms display stage- and tissue-specific responses to 20-hydroxyecdysone. *Sci. Rep.*, 5: 12114.

Li Y, Jiang J, Liu W, Wang H, Zhao L, Liu S, Li P, Zhang S, Sun C, Wu Y, Yu S, Li X, Zhang H, Qian H, Zhang D, Guo F, Zhai Q, Ding Q, Wang L, Ying H, 2018. microRNA-378 promotes autophagy and inhibits apoptosis in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115(46): E10849–E10858.

Li Y, Wang H, Tao K, Xiao Q, Huang Z, Zhong L, Cao W, Wen J, Feng W, 2013. miR-29b suppresses CML cell proliferation and induces apoptosis via regulation of BCR/ABL1 protein. *Exp. Cell Res.*, 319(8): 1094–1101.

Ling L, Ge X, Li Z, Zeng B, Xu J, Chen X, Shang P, James AA, Huang Y, Tan A, 2015. MiR-2 family targets *awd* and *fng* to regulate wing morphogenesis in *Bombyx mori*. *RNA Biol.*, 12(7): 742–748.

Liu Z, Ling L, Xu J, Zeng B, Huang Y, Shang P, Tan A, 2018. MicroRNA-14 regulates larval development time in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 93: 57–65.

Liu ZL, Xu J, Ling L, Yang DH, Chen SQ, Huang YP, 2019. MicroRNA-2738 regulates gene expression in the sex determination pathway in *Bombyx mori*. *Insect Sci.*, https://doi.org/10.1111/1744-7917.12694.

Lucas K, Raikhel AS, 2013. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(1): 24–38.

Matsuoka T, Fujiwara H, 2000. Expression of ecdysteroid-regulated genes is reduced specifically in the wing discs of the wing-deficient mutant (*fl*) of *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.*, 210(3): 120–128.

Nelson C, Ambros V, Baehrecke EH, 2014. miR-14 regulates autophagy during developmental cell death by targeting *ip3-kinase* 2. *Mol. Cell*, 56(3): 376–388.

Peng W, Zheng WW, Tariq K, Yu SN, Zhang HY, 2019. MicroRNA Let-7 targets the ecdysone signaling pathway E75 gene to control larval-pupal development in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Sci.*, 26(2): 229–239.

Quah S, Breuker CJ, Holland PWH, 2015. A diversity of conserved and novel ovarian microRNAs in the speckled wood (*Pararge aegeria*). *PLoS ONE*, 10(11): e0142243.

Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW, 2000. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam. Horm.*, 60: 1–73.

Segraves WA, Hogness DS, 1990. The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev.*, 4(2): 204–219.

Shirai H, Kamimura M, Yamaguchi J, Imanishi S, Kojima T, Fujiwara H, 2012. Two adjacent cis-regulatory elements are required for ecdysone response of *ecdysone receptor* (*EcR*) *B1* transcription. *PLoS ONE*, 7(11): e49348.

Silwal P, Kim YS, Basu J, Jo EK, 2019. The roles of microRNAs in regulation of autophagy during bacterial infection. *Semin. Cell Dev. Biol.*, https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.07.011.

Swevers L, Eystathioy T, Iatrou K, 2002. The orphan nuclear receptors BmE75A and BmE75C of the silkmoth *Bombyx mori*: hornmonal control and ovarian expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(12): 1643–1652.

Terashima J, Bownes M, 2006. *E75A* and *E75B* have opposite effects on the apoptosis/development choice of the *Drosophila* egg chamber. *Cell Death Differ.*, 13(3): 454–464.

Texada MJ, Malita A, Christensen CF, Dall KB, Faergeman NJ, Nagy S, Halberg KA, Rewitz K, 2019. Autophagy-mediated cholesterol trafficking controls steroid production. *Dev. Cell*, 48(5): 659–671.

Xu SJ, Hu HT, Li HL, Chang S, 2019. The role of miRNAs in immune cell development, immune cell activation, and tumor immunity: with a focus on macrophages and natural killer cells. *Cells*, 8(10): 1140.

Yang JJ, Wang YZ, Wei BF, Xing QT, Kan YC, Qiao HL, 2018. Regulation of the expression of chemosensory protein gene *csp9* by miR-301 in *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 61(10): 1145–1152. [杨娟娟, 王远卓, 魏博帆, 邢秋婷, 阚云超, 乔惠丽, 2018. 家蚕 miR-301 对化学感受蛋白 *csp9* 表达的调控. 昆虫学报, 61(10): 1145–1152]

Yin PV, Thummel CS, 2005. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16(2): 237–243.

Zhang X, Zheng Y, Jagadeeswaran G, Ren R, Sunkar R, Jiang H, 2012. Identification and developmental profiling of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(6): 381–395.

Zhao Y, Wang Z, Zhang W, Zhang L, 2019. MicroRNAs play an essential role in autophagy regulation in various disease phenotypes. *Biofactors*, 45(6): 844–856.

Zhou B, Hiruma K, Jindra M, Shinoda T, Segraves WA, Malone F, Riddiford LM, 1998. Regulation of the transcription factor E75 by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval molting and metamorphosis. *Dev. Biol.*, 193(2): 127–138.

(责任编辑: 马丽萍)